UNTERSUCHUNGEN ZUR IDENTIFIKATION DER PLASMAPHOSPHATIDE

Yahya Kawarizadeh

1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555224_0089

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

UNTERSUCHUNGEN ZUR IDENTIFIKATION DER PLASMAPHOSPHATIDE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Yahya Kawarizadeh

aus Basrah/Iran

München 1964

Dissertations-Druckerei Charlotte Schön, München 23, Belgradstr. 11, Tel. 361402

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Professor Dr. N. ZÖLLNER
Korreferent:	Professor Dr. W. SEITZ
Dekan:	Professor Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 10. 1964

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEK - LEIDEN -

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Einleitung:		
I.	Methodik:	6
	1. Geräte und Reagentien:	6
	2. Herstellung eines Lipoidextraktes:	6
	3. Chromatographie:	7
	4. Analyse der Phosphatide:	8
	5. Analyse der Fettsäureester:	9
	A. Herstellung der einzelnen Reagentien:	9
	B. Vorgang:	10
	6. Papierchromatographie der Phosphatide:	10
	7. Hydrolyse:	11
	A. Scharfe Hydrolyse:	11
	B. Leichte Hydrolyse:	12
	8. Dünnschichtchromatographie:	13
II.	Ergebnisse:	15
III.	Zusammenfassung:	26
IV.	Literaturverzeichnis:	28

EINLEITUNG

Obwohl in den letzten Jahren die Identifizierung einzelner Lipoidgruppen des menschlichen Plasmas bis zur Auftrennung selbst komplizierter Gemische durch die Verfeinerung des Chromatographieverfahrens ermöglicht worden ist, konnte die Zusammensetzung der Phosphatide nur unzureichend aufgeklärt werden. Bis vor kurzem hat man z. B. angenommen, daß die Phosphatid-Zusammensetzung des menschlichen Plasmas aus Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin besteht, wie aus der Mitteilung von Hirsch und Ahrens (4) zu ersehen ist. Diese Methode befaßt sich mit Säulenchromatographie und gestattet eine weitgehende Trennung einzelner Phosphatidfraktionen. Es wurde aber experimentell bewiesen, daß noch die Lysolecithine vorkommen. Dies wurde erst durch die Mitteilung von Gjone und Mitarb. (2) bekannt. Sie glauben in ähnlichen Fraktionen noch Lysolecithine identifizieren zu können. L. Hörhammer und G. Richter (5) ist es gelungen, mit Hilfe der Papierchromatographie und Färbereaktionen eine Identifizierung von Rohphosphatidgemischen bzw. Fraktionen zu ermöglichen. Eine Identifizierung oder Trennung des Lecithin- von dem Sphingomyelin-Gemisch wurde dagegen nicht erreicht. N. Zöllner und K. Kirsch (9) glauben, die Lysokephaline identifiziert zu haben.

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, in welchen Verhältnissen die wichtigsten Phosphatidfraktionen im Plasma vorkommen und außerdem prüfen, ob neben ihnen noch kleine Mengen anderer Phosphatide nachzuweisen sind.

I. METHODIK

1. GERÄTE UND REAGENTIEN:

Die Säulenchromatographie wird nach Vorschriften von Hirsch und Ahrens (4), vor allem bezüglich der Dimensionen des Chromatographierohres und der Menge des Adsorbens, aufgebaut.

Die im Original angegebene Metallkanüle wird durch ein gewöhnliches, schräg abgeschnittenes Glasrohr ersetzt, die als Abtropfspitze dient. Als Fraktionssammler wird das Gerät der Zentralwerkstätten Göttingen verwendet. Zu den Analysen werden die Lösungsmittel und Reagentien mit p. a. Reinheitsgrad verwendet. Die einzelnen Lösungsmittel und Reagentien werden in den zugehörigen Abschnitten angegeben.

2. HERSTELLUNG EINES LIPOIDEXTRAKTES:

In ein mit Heparin-Substanz (Biochemica Roche) beschicktes Glasgefäß wird wie üblich Blut entnommen. Es wird sofort nach der Entnahme in der Kälte zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma wird mit 16 Vol. Chloroform-Methanolgemisch im Verhältnis 1 : 1 gefällt und im Wasserbad bei 70 ^{o}C kurz aufgekocht. Nach sofortiger Abkühlung wird soviel Vol. Chloroform zugefügt, bis das Verhältnis von Chloroform zu Methanol 2 : 1 beträgt. Dabei ist zu beachten, daß die Mischung ein genau meßbares Volumen aufweist, welches die Berechnung des Quotienten vereinfacht. Der Chloroform-Methanolextrakt wird abfiltriert. Das Filtrat wird mit 1,5 Vol. wässriger, o,02 proz. $CaCl_2$-Lösung überschichtet und dann in einem gradnierten Schüttelzylinder kräftig durchgeschüttelt.

Nach 12- bis 16-stündigem Stehen wird für eine quantitative Bestimmung die Phasengrenze abgelesen und notiert. Die obere Phase wird dann mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Die untere Phase, die die Lipoide enthält, wird im Wasserbad unter Stickstoffathmosphäre zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in Petroläther (KP 50-70) aufgenommen und nach mehrfacher Auswaschung mit kleinem Vol. Petroläther in der Chromatographiesäule eingesetzt. Es ist zu beachten, daß für die Vergleichsanalyse ein aliquoter Teil des Extraktes abgezweigt wird.

3. CHROMATOGRAPHIE:

Als Adsorbens wird die ungemahlene Kieselsäure (Mallinckrodt-100 Mesh, Serva Heidelberg) bevorzugt. Bezüglich der Vorbereitung des Adsorbens darf ich auf die Original-Vorschrift von Hirsch und Ahrens (4) verweisen. Nach 10- bis 12 stündigem Erhitzen im Trockenschrank bei 115° C wird eine entsprechende Portion der so vorbereiteten Kieselsäure - pro 200 mg Lipoid 10 g Kieselsäure - langsam aber kontinuierlich in das Chromatographierohr unter Beklopfen des Rohres eingestäubt. Zur Vermeidung der bei dieser Technik gelegentlich vorkommenden Luftblasen zwischen den Kieselsäureteilchen und zur Vereinfachung kann die Kieselsäure auch in einem dreifachen Volumen Chloroform-Methanolgemisch im Verhältnis 4 : 1 aufgelöst und in das Chromatographierohr eingebracht werden. Die Säule wird, um eine festere Packung des Adsorbens zu erreichen, an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, die man für mehrere Stunden kräftig saugen läßt. Nach Vorwaschung der Säule wie bei Hirsch und Ahrens (4) werden die im Petroläther gelösten Lipoide aufgetragen, so daß ein Gesamtvolumen von 12 ml Petroläther pro 10 g Säule nicht überschritten wird.

Die Außentemperatur des Chromatographierohres beträgt 20° C, die über den ganzen Chromatographievorgang konstant bleiben sollte. Die Elution erfolgt bei steigender Konzentration von Äther in Petroleumbenzin. KP 50 - 70°, Riedel de Haen.

1 % Äther in Petroleumbenzin	200 ml
4 % " " "	250 ml
20 % " " "	150 ml
reiner Äther	70 ml.

Eine Entwicklung mir teinem Äthyläther ist nach unserer Erfahrung angebracht, wenn man nur den Phosphatidanteil des Extraktes absondern will. Die Phosphatide bleiben dabei in der Säule zurück. Für die Auftrennung der Phosphatide ist die Entwicklung mit Chloroform-Methanolgemischen nötig.

Die bisher angewandten Mischungsverhältnisse sind folgende:

Chloroform		70 ml
Chloroform/Methanol	4 : 1	100 ml
" "	3 : 2	100 ml
" "	1 : 4	200 ml
reines Methanol		100 ml.

Die o.g. Zahlen gelten für 10 g Säule.

Diese Losungsmittelgemische brachten keine optimalen Ergebnisse, ermoglichten jedoch die Auftrennung der 5 folgenden Fraktionen:

Kephalin, Lysokephalin, Lecithin, Sphingomyelin, Lysolecithin.

4. ANALYSE DER PHOSPHATIDE:

Die quantitative Bestimmung der Phosphatide erfolgt nach Bartlett
Aus den jeweiligen Fraktionen werden je nach P-Gehalt 0,1 - 1 ml doppelanalytisch in hitzebeständige und säuberlich ausgespulte Reagenzglaser ubertragen. Die Auswahl der jeweiligen Volumina und damit des P-Gehalts der Probe ist rein empirisch ausgearbeitet, so daß die Extinktionswerte im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 830 mu 0,400 nicht uberschreiten. Der optimale Bereich mit der geringsten Fehlerbreite liegt bei 0,150 - 0,300 Extinktion. Steigt jedoch der P-Gehalt übermäßig an, so läuft die Eichkurve nicht mehr geradlienig, sondern weist niedrigere Werte auf (s. dazu Fig. 1).

Es ist daher empfehlenswert, daß die einzelnen Reagenzgläser einen P-Gehalt von 2 - 4 γ enthalten. Das Lösungsmittel wird im Wasserbad bei ca. 60° C bis zur Trockne abgedampft.

Nach Zugabe von 0,5 ml 10 n H_2 SO4 wird bei 160° C etwa 4 Stunden verascht. Nach Abkühlung werden je 2 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd in Form von Perhydrol hinzugefügt und zur Beseitigung des hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyds wird wieder für 2 weitere Stunden bei 160° C erhitzt. Nach Herausnahme der Reagenzgläser ist zu beachten, daß der Inhalt farblos ist. Sollte der Inhalt eine bräunliche Farbe aufweisen, ist eine abermalige Zugabe von Perhydrol und anschließendes Veraschen notwendig. Zur Kontrolle werden für die Ablesung noch 2 weitere Standard - und Leerwerte wie oben doppelanalytisch jedoch ohne Einsetzung in den Veraschungsvorgang als Kaltwerte reserviert. Ein Standard- und ein Leerwert werden doppelanalytisch mit verascht. Es erfolgt nun die Zugabe folgender Reagentien:

Ammoniummolybdat	0,4 ml
Reduktionsmittel	0,2 ml
aqua dest. ad	5,0 ml

Zu beachten ist, daß den Kaltwerten die gleiche Menge H_2SO4 hinzugefügt wird, die andere Gläser beinhalten (s.o.).

Die einzelnen Proben werden mit einem Glasstab gut durchmischt. die Reagenzgläser mit Glaskugeln verschlossen und etwa 7 Min. in kochendem Wasserbad ge-

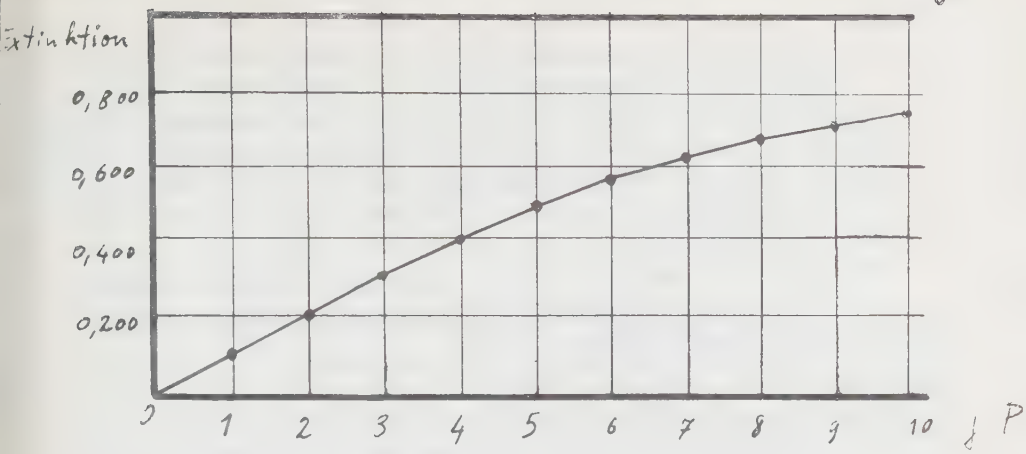


Fig. 1 (Eichkurve)

kocht. Nach Abkühlung wird der Inhalt wieder durchmischt und in die entsprechenden 1cm-Küvetten übertragen. Die Photometriewerte liest man gegen dest. Wasser bei 830 m μ ab. Die Rechnung erfolgt nach dem jeweiligen Abzug des mittleren Leerwertes. Der Standardwert beträgt normalerweise bei 830 m μ Zeiss Spektoralphotometer für 2 γ Phosphor 0,180 - 0,220, abhängig von der Charge des Reduktionsmittels (s. dazu Tabelle II. a). Zur Umrechnung auf Phosphatide wird der Phosphorgehalt mit Faktor 25 multipliziert.

5. ANALYSE DER FETTSÄUREESTER:

Zur Identifizierung der einzelnen Phosphatidfraktionen ist eine gleichzeitige Berechnung der Fettsäureester notwendig. Die Bestimmung erfolgt nach Rapport u. Alonzo (7)., Es werden jeweils etwa 10mal soviel Volumina, wie sie für die Phosphorbestimmung notwendig sind, von der gelösten Testsubstanz in entsprechende Reagenzgläser aufgenommen und im Wasserbad zur Trockene gebracht. Dann werden noch folgende Reagentien hinzugefügt.

A Herstellung der einzelnen Reagentien:

a: Filtrat.

aa) 1 g NaoH wird in 1,7 ml dest. Wasser gut aufgelöst und mit 32,3 ml absolutem Aethanol gemischt.

bb) Zu 1 g Hydroxylaminhydrochlorid werden 1,7 ml dest. Wasser und 32,3 ml absoluter Aethanol gegeben.

cc) Es werden dann jeweils gleiche Volumina von den beiden oben genannten Lösungen zusammengegeben (z. B. 5 : 5 ml). Nach ca. einstundigem Stehen wird die Mischung mittels eines dichten Filterpapiers abfiltriert. Dieses Filtrat muß vor jeder Untersuchung frisch hergestellt werden, da die Lösung nur einige Stunden haltbar ist.

b: Fe ^{III}-perchlorat:

0,5 mg Fe^{III}-perchlorat wird in eine Mischung von 4,7 ml 95%igem Alkohol und 13 ml 70%iger Perchlorsäure gegeben. Diese Lösung ist etwa 14 Tage haltbar.

B Vorgang:

Nun wird in jedes zur Fettsäureesterbestimmung vorgesehene Reagenzglas eine Mischung von 3 ml Äther und 0,1 ml von dem, wie oben beschrieben hergestellten, Filtrat hinzugefügt und mit einem Glasstab gut durchgemischt.

In einem Wasserbad von 62-68° wird unter Schütteln abgedampft und letzte Reste mit N_2 zur Trockne gebracht. Zum trockenen Rückstand gibt man 6 ml der Eisenperchloratlösung. Die Reaktionszeit beträgt 3 Min. Während dieser Zeit muß der Färbevorgang vollzogen sein, sonst sind ungenaue Ergebnisse zu erwarten. Es wird sofort spektralphotometrisch bei 530 m μ gegen Alkohol abgelesen. Dabei ist zu beachten, daß die Untersuchung wie bei P-Bestimmung doppelanalytisch erfolgt und gleichzeitig 2 Leer- und Standardwerte mit bestimmt werden. Als Standardwert wird Triolein (E. Merck) verwendet (diese Substanz ist frei von unveresterten Fettsäuren). Als Eichwert ergeben 450 γ Triolein eine Extinktion von 0,260 - 0,270 bei 530 m μ in einer 1 cm-Küvette (abgelesen im Zeiss-Spektralphotometer).

6. PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER PHOSPHATIDE:

Zur genaueren Identifizierung einzelner Phosphatidfraktionen ist ihre Auftrennung durch Papierchromatographie notwendig. Das Verfahren basiert auf einer Mitteilung von L. Hörhammer und Mitarb. (5) und erlaubt in einer auswertbaren Weise eine weitgehende Identifizierung einzelner Phosphatidgruppen, wobei durch die Trennung und Spezialfärbung die Fraktionen qualitativ nachgewiesen werden. Bei diesem Verfahren wird mit einem Formalin-Papier (Nr. 2045 b Gl der Fa. Schleicher & Schüll) gearbeitet. Als Laufmittel benützt man ein Butanol-Eisessig-Wassergemisch im Verhältnis von 4 : 1 : 5. Bezüglich der Chromatographietechnik darf ich auf die Originalvorschriften nach Hörhammer u. Mitarb. (5) verweisen.

7. HYDROLYSE:

Mit den bisher angegebenen Methoden gelingt es, eine Reihe von Fraktionen zu identifizieren. Jedoch ist die Auftrennung bzw. Identifizierung der Lecithin- von der Sphingomyelinfraktion nicht möglich. Um diese beiden Fraktionen genauer zu untersuchen, werden die Phosphatide einer Hydrolyse unterzogen.

A Scharfe Hydrolyse:

500 γ Rohphosphatide werden nach dem üblichen Abdampfen des Lösungsmittels mit 1 n H_2SO4 in Methanol 6 Stunden im Rückflußkühler bei 60 - 70° C hydrolisiert (0,55 ml konz. H_2SO4 in 20 ml Methanol). Nach dem Hydrolisierungsvorgang wird die überschüssige Säure mit einer entsprechenden Menge KOH neutralisiert. Die Neutralisation wird mit Hilfe kleiner Mengen von $NaHCO_3$ nachgeprüft, wobei auf die CO_2-Entwicklung zu achten ist. Der PH-Wert wird mit Hilfe des Universalindikators (E. Merck) bestimmt. Hierbei ist ein PH-Wert von 5 erforderlich. Es wird einige Male mit ca. 1 ml Petroläther (Kp. 50 - 70° C) gewaschen, wobei jeweils die obere Phase mit einem Saugapparat abgetrennt und extrahiert wird (s. Fig. 2).

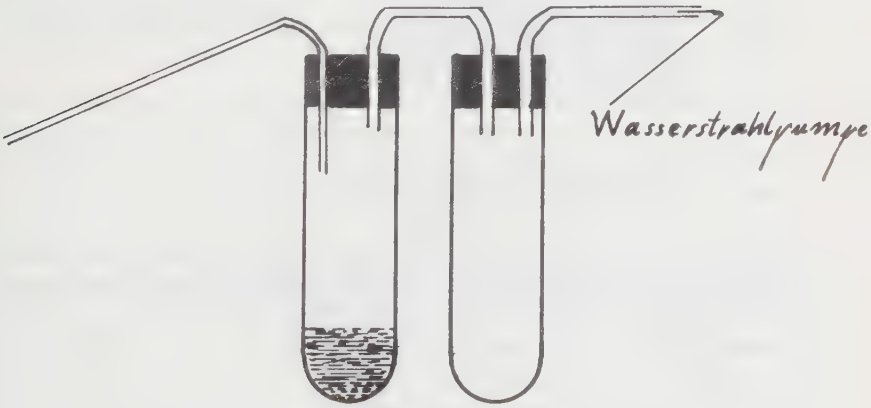


Fig. 2

Das Petroläther wird dann im Wasserbad bei ca. 60 - 70° C abgedampft. Der Rückstand wird in ein Volumen von 0,1 ml. Chloroform aufgenommen.

B Leichte Hydrolyse (Verseifung):

Die erforderliche Phosphatid-Menge ist wiederum ca. 500 γ. Nach dem üblichen Abtrocknen wird dem Phosphatidextrakt 0,5 ml n KOH hinzugefügt und für 24 Stunden in einem Wasserbad bei 36° C stehengelassen. Zur Förderung des Verseifungsvorganges wird die Lösung während dieser Zeit einige male gut durchmischt. Nach Absetzen vom Wasserbad wird mit ca. 0,1 ml eine 5 n-HCL neutralisiert. Die Neutralisation wird wie ublicn durch $NaHCO_3$ und der PH-Wert durch Universalindikator nachgeprüft (der erforderliche PH-Wert ist 5). Die Phosphatide werden wie oben beschrieben mit Petroläther KP 50 - 70° C gewaschen, extrahiert und nach Abdampfen des Petroläthers in 0,1 ml Chloroform aufgenommen. Das durch die beiden Verfahren präparierte Material wird parallel zu einem Referenzstoff - ohne Verseifung - mit einer Menge von 100 γ auf ein Chromatographiepapier aufgetragen und wie beschrieben entwickelt (s. Seite 11). Die Auftragung erfolgt mittels Mikropipetten (auf 1 ml graduiert). Es ist ratsam, die Substanzen unter einem Stickstoffgeblase auf das Chromatographiepapier aufzutragen, um die Ausdehnung der Substanzen auf eine größere Fläche zu vermeiden, denn je kleiner der Startpunkt ist, um so scharfer sind dann die Trenneffekte. Die übliche Heißplatte als Unterlage wird hier vermieden, da die Phosphatide sehr hitzeunbeständig sind und sich bei einer übermäßigen Hitze verändern.

Die Sphingomyelinfraktion zeigt bei der leichten Hydrolyse eine positive und bei der scharfen eine negative Cholinfarbung, dagegen aber positive Ninhydrinfärbung mit einem Rf-Wert von 0,72. Die Ninhydrinfärbung ist aber für Sphingomyelin indifferent.

Zu dieser Frage wurden auch einige Versuche mit Sphingomyelin aus Rinder-Gehirn parallel zu dem Serumextrakt durchgeführt. Die Ergebnisse waren wiederholt dieselben wie oben angegeben.

(s. Fig. 3).

Papierchromatogramm.
Versuch mit Sphingomyelin
aus Gehirnsubstanz

S. H. = Starke Hydrolyse
L. H. = Leichte Hydrolyse
-. -. = Cholin positive Färbung
——— = Ninhydrin positive Färbung

8. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE (3):

Mit Hilfe dieser Methode wird versucht, alle Phosphatide in einem Arbeitsgang zu trennen, wobei die Trennergebnisse zum Vergleich der chemischen Analyse herangezogen werden. Die Trennung erfolgt nach einer Mitteilung von E. Habermann u. Mitarb. (3) mit Hilfe eines Chloroform-Methanol-Wassergemisches im Verhältnis von 6,5 : 2,5 : 0,4 als Laufmittel und auf einer mit Kieselgel-G (E. Merck) beschichteten Platte. Bezüglich der Auftragungstechnik und Allgemeinregel der Dünnschichtchromatographie darf ich auf die Originalvorschriften von E. Stahl (8) verweisen. Zum Auftragen benötigt man eine Menge von ca. 40 γ Phosphatide.

Die Färbung erfolgt nach der Mitteilung von Jatzkewitz (6). Die Trenneffekte sind bei dieser Methode wesentlich schärfer, so daß alle Fraktionen einwandrei identifiziert werden.

Siehe dazu Fig. 4.

Dünnschichtchromatogram von

Versuch Person B

C = Lecithin

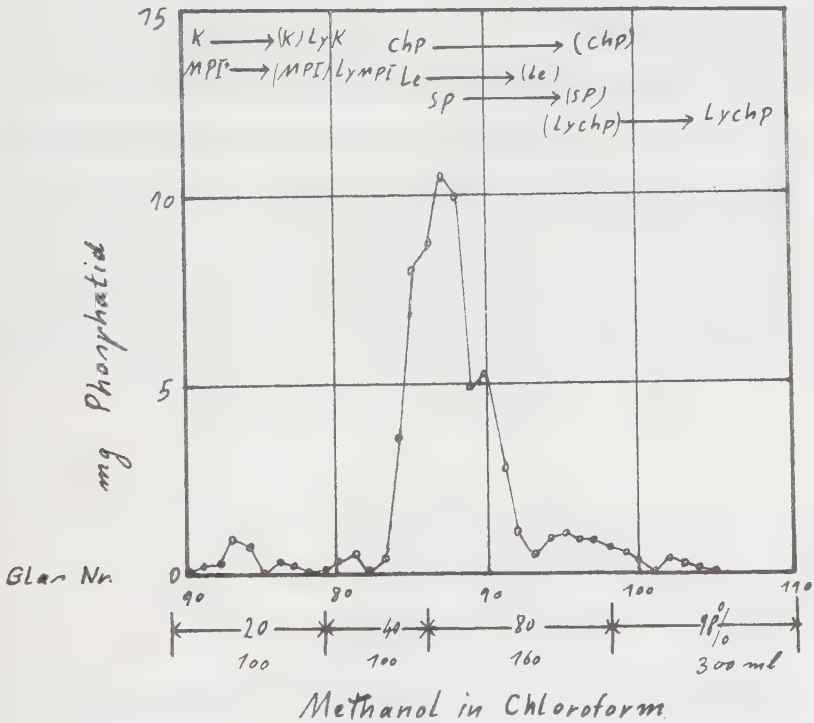
B = Sphingomyelin

A = Lysolecithin

Zum Vergleich werden die analytischen Daten in der Tabelle V, S.22 angegeben.

ERGEBNISSE

Phosphatide: In mehreren Arbeitsgängen gelang es mit Hilfe der angegebenen Lösungsmittelfolge die Phosphatide in eine Reihe von Fraktionen, wie auf Seite 5 angegeben, aufzutrennen. Zur Veranschaulichung der Menge der Fraktionen werden die Analysen bei zwei Versuchspersonen ausführlich beschrieben (siehe Figur 5 und 6).



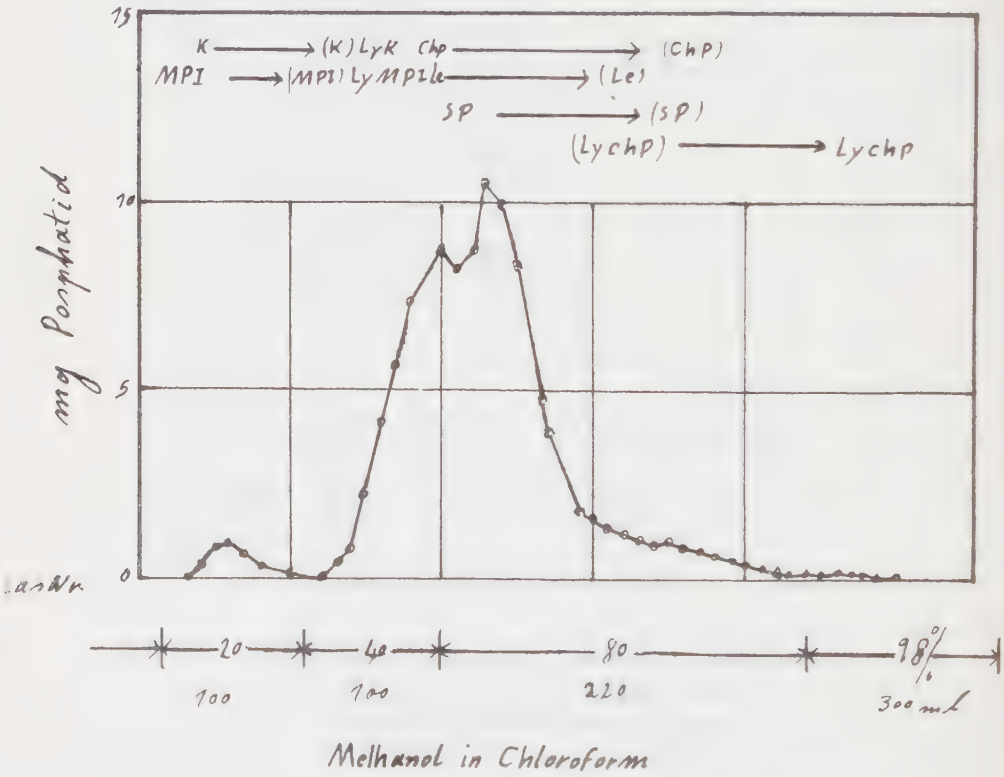
Figur 5 (Versuch A) Säulenchromatogramm der Phosphatide eines 30 jährigen Mannes. Einsatz Lipoidextrakt von 27 ml Plasma. Die Füllung in Glas 86 war geringer als die der übrigen Gläser (Laufmittelwechsel).

Die Ergebnisse der Papierchromatographie des Gläserinhalts, herangezogen zur Identifizierung, sind oberhalb des Chromatogramms ersichtlich.

Dabei wurden folgende Abkürzungen gewählt

K (Colamin- oder Serinkephalin MPI Monophosphorinosit)
LyK (Lysokephalin)
ChP (Cholin-Phosphatid)
MPI (Monophosphorinositid)
LyMPI (Lysomonophosphorinositid)
LyChP (Lysocholinphosphatid)

Die in Klammer gesetzen Symbole bedeuten Nachweis von geringen Mengen.



Figur 6 (Versuch B) Säulenchromatogramm der Phosphatide eines 47 jährigen Mannes, mit Idiopathischer, familiären Hypercholesterinämie.

Einsatz Lipoidextrakt von 25 ml Plasma

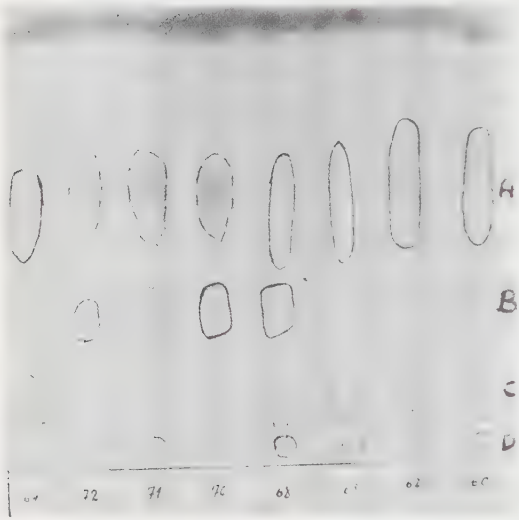
Beim Versuch A erscheinen zunächst 2 kleine Gipfel, (siehe Abb. 5), die bei Versuch B als einziger Gipfel zusammenfallen (siehe Abb. 6) und bei entsprechenden Färbevorgängen Ninhydrin-positiv und Cholin-negativ sind.

In den ersten Gipfeln werden neben Kephalinen (Colamin und Serin-Kephalin), (Normenklatur nach Debuch, in Anlehnung an Mac Lean), Monophosphorinosit, (Diphosphorinosit) und kleine Mengen eines bisher noch nicht identifizierbaren Amins, das wahrscheinlich ein Restbestandteil eines Lipoids darstellt, nachgewiesen. Siehe dazu Figur 7. Die Lysokephalinfraktion erscheint beim Versuch A im zweiten Anfangsgipfel, dagegen beim Versuch B im ansteigenden Anfangsteil des Hauptgipfels, welcher der Cholinfraktion entspricht, und zwar zunächst Lecithin mit absteigender Konzentration und anschließend Sphingomyeline.

Der Nachgipfel wird lediglich durch Lyselecithin gebildet. Siehe Figur 8.

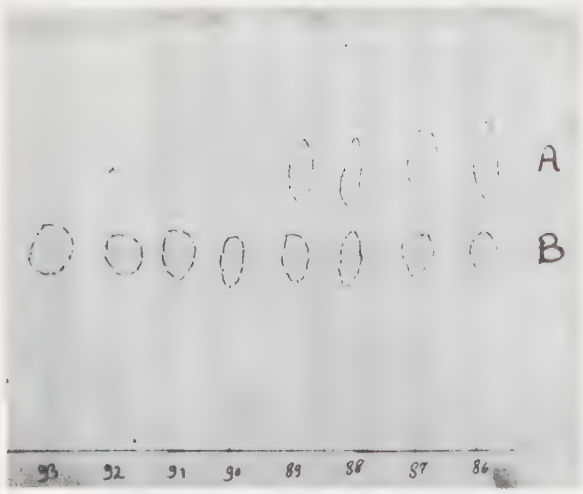
Am Schluß der Lyselecithinfraktion erscheint noch eine geringe Menge nicht nachweisbares Phosphatid, das leider durch unsere Methodik nicht zu ermitteln ist. Diese Schlußfraktion fällt mit letzter Eluierung mir reinem Methanol zusammen. In den folgenden Tabellen sollen die Einzelheiten und Bestimmungen der Phosphatide in den einzelnen Gläsern angegeben werden. Die Trennverhältnisse werden beim Versuch B durch Fig. 4, 7 und 8 wiedergegeben. Die analytischen Daten dazu sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich.

Papierchromatographische Untersuchungen
(Fotokopie) von Versuch B
(siehe auch dazu Tabelle V S. 24)



Figur 7
-.-.- = Cholinfärbung
——— = Cholamin (Ninhydrin)

A von 60-64 = Kephaline
A von 70-72 = Lecithin
B = Lysokephalin
C = Phosphorinositid
D = nicht identifiziertes Amin



Figur 8
A = Sphingomeyelin
B = Lysolecithin

Tabelle I: Phosphatidbestimmungen der Gläser 70-83 von Versuchsperson A

P - Bestimmungen nach Bartlett (Zeiss-Spektralphotometer, bei 830 m μ gegen Alkohol abgelesen).

Glas	Estinktionswerte nach Leerwertabzug (Mittelwert)	P in γ in 1 ml	P in γ auf 10 ml angerechnet	Phosphatid in mg angegeben
70	0,032	0,32	3,2	0,080
71	0,080	0,80	8,0	0,200
72	0,082	0,82	8,2	0,205
73	0,382	3,80	38,2	0,949
74	0,291	2,90	29,0	0,725
75	--	--	--	--
76	0,110	1,08	10,8	0,270
77	0,074	0,74	7,4	0,185
78	0,037	0,37	3,7	0,092
79	--	--	--	--
80	0,108	1,07	10,7	0,268
81	0,200	2,00	20,0	0,500
82	0,046	0,46	4,6	0,115
83	0,148	1,46	14,6	0,365

Eichwert 2 γ = 0,201

Tabelle II: Gleichzeitige Bestimmung von veresterten Fettsäuren (Versuchsperson A)

Tabelle II a) P-Bestimmung der Gläser 84 - 102

Glas	Versuchsmenge in ml	Extinktionswerte nach Leerwertabzug (Mittelwert)	P in γ	P in γ auf 10 ml angerechnet	P in μ Mol	Phosphatid in mg
84	0,2	0,291	2,85	142,5	4,51	3,562
85	0,1	0,327	3,21	321	10,35	8,020
86	0,1	0,356	3,499	350	11,28	8,750
87	0,1	0,430	4,21	421	13,58	10,550
88	0,1	0,407	4,0	400	12,9	10,0
89	0,2	0,403	3,95	197	6,38	4,94
90	0,2	0,430	4,22	211	7,01	5,27
91	0,4	0,447	4,38	109	3,53	2,74
92	0,4	0,166	1,63	41	1,31	1,02
93	0,3	0,056	0,55	18	0,59	0,45
94	0,3	0,120	1,18	39	1,26	0,98
95	0,5	0,205	2,01	40,2	1,29	1,01
96	0,4	0,140	1,37	34,0	1,08	0,85
97	0,4	0,157	1,54	38,5	1,24	0,96
100	0,3	0,064	0,63	20,8	0,67	0,52
102	0,3	0,028	0,28	9,2	0,3	0,24

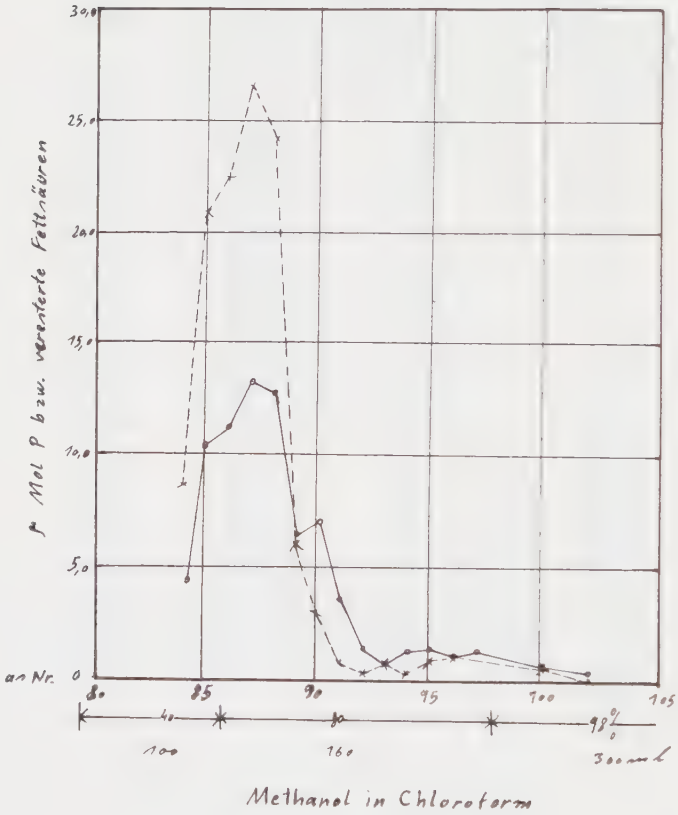
Eichwert 2 γ = 0,204

Tabelle II b) Bestimmung der Veresterten Fettsäuren nach Rapport und Alonzo (7) (Zeiss-Spektralphotometer bei 530 m μ gegen Alkohol abgelesen).

Glas	Versuchs-menge in ml	Extinktionswert nach Leerwertab-zug (Mittelwert)	Veresterte Fettsäuren in γ	auf 10 ml in mg	in μ Mol
84	2,0	0,297	510	2,55	8,65
85	1,0	0,370	640	6,40	20,7
86	1,0	0,383	662	6,40	22,45
87	1,0	0,458	792	7,92	26,85
88	1,0	0,395	684	6,84	23,17
89	1,0	0,212	366	1,83	6,11
90	2,0	0,105	180	0,90	3,05
91	4,0	0,052	90	0,22	0,76
92	4,0	0,015	26	0,07	0,22
93	3,0	0,022	38	0,13	0,43
94	3,0	0,016	28	0,069	0,24
95	5,0	0,052	90	0,18	0,77
96	4,0	0,076	132	0,33	1,12
97	4,0	0,090	156	0,39	1,32
100	3,0	0,028	49	0,16	0,55
102	3,0	0,005	9	0,03	0,1

Eichwert 449 γ = 0,260

Gleichzeitige Bestimmung von veresterten Fettsäuren und P umgerechnet in m Mol und dargestellt durch Figur 9



Figur 9 veresterte Fettsäuren x.....x und Lipoidphosphor o———o

Tabelle III Versuchsperson A
Die Verteilung von Lecithin, Sphingomyelin und Lysolecithin in den Gläsern 84 - 105 (vgl. Abb. 5).

Glas	Quotient aus veresterten Fettsäuren und P	Lecithin mg	Sphingomyelin mg	Lysolecithin mg
84	1,92	3,56		
85	2,00	8,02		
86	1,99	8,74		
87	1,97	10,55		
88	1,80	8,98	1,00	
89	0,96	2,38	2,56	
90	0,44	1,16	4,09	
91	0,22	0,30	2,44	
92	0,17	0,09	0,93	
93			0,45	
94	0,19		0,79	0,19
95	0,59		0,41	0,60
96	1,04			0,85
97	1,06			0,96
98-105				2,42
		43,78	12,67	5,02

Tabelle IV Zusammensetzung der Serumphosphatide
Versuchsperson A (Abb. 5 und 9)

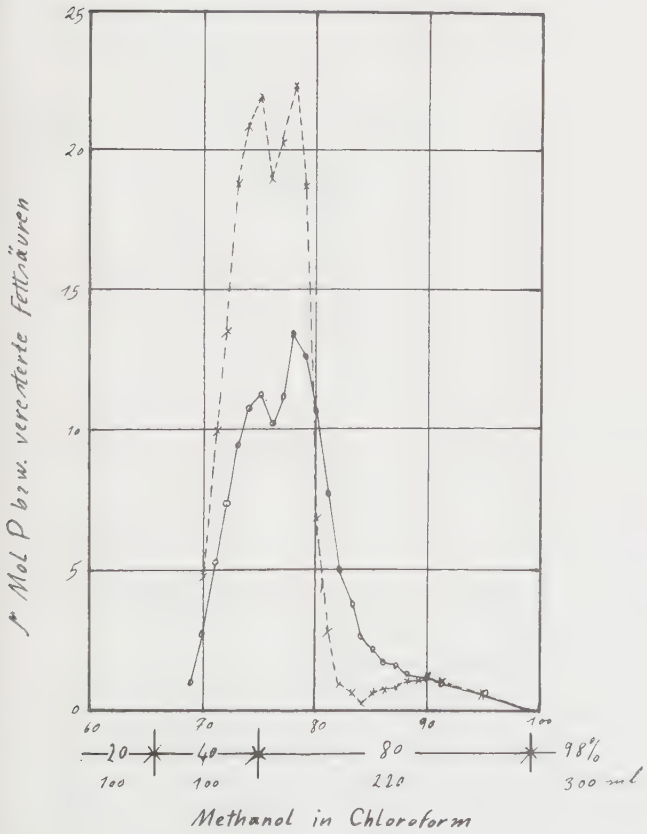
	mg pro 100 ml plasma	Prozent des Gesamt-Phosphatid
Lecithin	162,2	66,8
Lysolecithin	18,6	7,7
Kephaline (Colamin- und Serinkephalin)		
Monophosphorinositid	10,0	4,1
Lysokephaline	4,7	1,9
Sphingomyelin	46,9	19,3
	242,4	99,8

Tabelle V Versuchsperson B
Die Verteilung von Kephalinen, Lysokephalinen, Lecithin, Sphingomyelin und Lysolecithin.
Gläser 59 - 105 (vgl. Abb. 6)

Glas	Quotient aus veresterten Fettsäuren und P	Kephaline und Monophosphorinositid mg	Lysokephaline mg	Lecithin mg	Sphingomyelin mg	Lysolecithin mg
59-67	1,98	3,39	Spuren			
68		Spuren	0,35			
69	1,21		0,61	0,16		
70	1,73		0,73	1,45		
71	1,88		0,50	3,97		
72	1,95		Spuren	5,71		
73	1,99		(Spuren)	7,33		
74	1,94			8,13	(Spuren)	
75	1,93			8,73	Spuren	
76	1,85			7,24	0,59	
77	1,80			7,78	0,86	
78	1,66			8,71	1,79	
79	1,47			7,24	2,61	
80	0,64			2,65	5,65	
81	0,37			1,13	4,95	
82	0,19			0,38	3,50	
83	0,17			0,25	2,62	
84	0,15			0,13	1,64	
85	0,31				1,15	
86	0,48				0,71	0,66
87	0,53				0,59	0,68
88	0,74				0,26	0,74
89	0,88				0,12	0,87
90	1,00					0,95
91	1,04					0,83
92	1,02					0,69
93-105						3,60
		3,39	2,19	66,09	27,09	9,53

Tabelle V.I Zusammensetzung der Serumphosphatide (Versuchsperson B der Abb. 6 u. 10)

	mg pro 100 ml Plasma	Prozent des Gesamt-Phosphatid
Lecithin	264,4	61,1
Lysolecithin	38,1	8,8
Kephaline (Colamin- und Serinkephalin)		
Monophosphorinositid	13,6	3,1
Lysokephaline	8,8	2,0
Sphingomyelin	108,4	25,0
	433,3	100,0



Figur 10 gleichzeitige Bestimmung von veresterten Fettsäuren x.....x und Lipoidphosphor o———o Versuchsperson B wie in Abb. 6. Auswertung der Ergebnisse in Tabelle V

ZUSAMMENFASSUNG

Aus einem Plasmalipoidextrakt heraus wurden mit Hilfe der Säulenchromatographie die Plasmaphosphatide soweit als moglich in Fraktionen aufgetrennt. Die Identifikation und quantitative Bestimmung der Fraktionen erfolgte einmal durch die Bestimmung des Gehaltes an Phosphor und den gesamten veresterten Fettsauren, zum anderen durch Papier- und Dünnschichtchromatographie unter Verwendung spezieller Färbemethoden vor und nach leichter - bzw. scharfer Hydrolyse der Phosphatide. Es konnten Kephaline, Lysokephaline, Lecithine, Sphingomyeline und Lysolecithine nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. N. ZÖLLNER für die Überlassung der Arbeit, für die vielseitigen Anregungen und die verständnisvolle Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Anschließend möchte ich mich auch bei Fräulein K. KIRSCH für Ihre freundliche Mithilfe bedanken.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BARTLETT, G. R.: J. biol. Chem. 234 466 (1959)
2. GJONE, E., J. F. BERRY and D. A. TURNER: J. Lipid Res. 1, 66 (1959)
3. HABERMANN, E. BANDTLAW, G. u. KRUSCHE, B. Klin. Wschr. Tg. 3931 Heft 15 (1961)
4. HIRSCH, J., and E. H. AHRENS jr.: J. biol. Chem. 233, 311 (1958)
5. HÖRHAMMER, L., H. WAGNER u. G. RICHTER: Biochem. Z. 331, 155 (1959)
6. JATZKEWITZ, H.: Hoppe Seylar's Zschr. physiol. Chem. 320, (1960), 251
7. RAPPORT, M. M., and N. ALONZO: J. biol. Chem. 217, 193 (1955)
8. STAHL, E.:
   a) Pharmac. Weekbl. 92 (1957), 829
   b) Chemiker Ztg. 82, (1958), 323
   c) Parfümerie und Kosmetik 39, (1958) 564
   d) Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 292/64 (1959), 411
9. ZÖLLNER, N. und K. KIRSCH: Zschr. exper. Med. 134, (1960), 10-28

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 1. 6. 1935 als Sohn des verstorbenen Kaufmanns Yassin K a w a r i z a d e h und seiner Ehefrau Ide, geb. Kawarizadeh in Basrah/Irak (Staatsangehörigkeit Iran) geboren.

1948 absolvierte ich in meiner Geburtsstadt die Volksschule, anschließend besuchte ich die Oberschule "Markazi" in Bagdad, die ich 1953 nach bestandenem Abitur verließ. 1954 absolvierte ich dann an der Oberschule "Tamadon" in Teheran das naturwissenschaftliche Fachabitur.

Nach zweijähriger Unterbrechung begann ich im April 1956 das Medizinstudium an der Universität München, wo ich im Winter 1959 die ärztliche Vorprüfung abgelegt habe. Die folgenden Semester studierte ich ebenfalls in München. 1960/1961 habe ich mich mit der vorgelegten Arbeit beschäftigt. Das medizinische Staatsexamen habe ich am 29. 5. 1964 ebenfalls in München abgelegt.

4

5

6

7

8

9.